

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ НЕИЗВЕСТНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОСТИЖЕНИЙ МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Н.А.Клюев

Институт проблем экологии и эволюции им.А.Н.Северцова РАН
117071, Москва, Ленинский пр-т, 33

Рассмотрены вопросы установления структуры неизвестного соединения с использованием данных, полученных в результате масс-спектрометрического эксперимента.

Главной темой настоящего обзора является критическое осмысление методических приемов, применяемых при расшифровке структуры^{*)} выделенных из матрицы (биологическая и природная среда, смесь химических компонентов и др.) индивидуальных соединений. В основу методологии по структурной интерпретации неизвестных соединений (НС) легли традиционные положения, взятые из ряда монографий [1-4]. Согласно этим положениям, схема I идентификации органического соединения (Рис. 1) включает следующие обязательные стадии: проверка индивидуальности анализируемого вещества (I); исследование физических свойств (II) и получение физических констант (III); качественный (сплавление с натрием) и количественный элементный анализ (IV); определение молекулярной массы соединения (V); оценка его растворимости (VI); качественные реакции на функциональные группы (VII); спектральные исследования (VIII); предварительное структурное отнесение исследуемого вещества - библиотечный поиск (IX); уточнение идентификации с помощью

Клюев Николай Алексеевич - заведующий лабораторией аналитической экотоксикологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова Российской академии наук, кандидат химических наук.

Область научных интересов: теоретическая органическая химия, молекулярная масс-спектрометрия, хромато-масс-спектрометрия, аналитические измерения в экологических исследованиях и фармакологии.

Автор более 450 публикаций в отечественных и международных изданиях и около 30 изобретений.

специальных реакций и приготовление производных (X). Последующая стадия не является оптимальной и надежной операцией по многим причинам, поэтому однозначность структурного отнесения контролируется идентичностью физических и спектральных данных НС и синтезированной модели, полученной встречным синтезом (XI). Основным недостатком схемы (рис. 1) является то, что она предназначена для идентификации вещества, находящегося в достаточном количестве у исследователя (>0.5-1 г) и обладающего небольшой молекулярной массой (>300-400 а.е.м.). Не умаляя достоинств существующих химических методов микроанализа и отмечая селективность проводимых реакций на функциональные группы, следует признать, что арсенал физических методов, оставляющих исследуемое вещество, как правило, без изменений в процессе эксперимента (методы УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии (VIII) по схеме (Рис. 1), используется не в полной мере. Это касается, прежде всего, высокочувствительного масс-спектрометрического метода (V), роль которого в схеме (Рис. 1) сужается до

есть то, что она предназначена для идентификации вещества, находящегося в достаточном количестве у исследователя (>0.5-1 г) и обладающего небольшой молекулярной массой (>300-400 а.е.м.). Не умаляя достоинств существующих химических методов микроанализа и отмечая селективность проводимых реакций на функциональные группы, следует признать, что арсенал физических методов, оставляющих исследуемое вещество, как правило, без изменений в процессе эксперимента (методы УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии (VIII) по схеме (Рис. 1), используется не в полной мере. Это касается, прежде всего, высокочувствительного масс-спектрометрического метода (V), роль которого в схеме (Рис. 1) сужается до

^{*)} Понятие идентификации структуры неизвестного органического вещества подразумевает изображение его химической структурной формулы, термин "строение" означает определение геометрии исследуемой молекулы с указанием длин связей, валентных (плоских) и двугранных углов в трехмерном пространстве.

определения молекулярной массы и брутто-состава НС. Установление элементного состава изучаемой молекулы требует применения масс-спектрометра с разрешением ($M/\Delta M$) выше 10000, что не является тривиальной аналитической задачей для исполнителя. Кроме того, понятие НС в рамках схемы (Рис. 1) предполагает соединение, описанное в литературе. К настоящему времени известно более 10 млн. индивидуальных органических соединений природного и синтетического происхождения (сейчас получают примерно 200 тысяч соединений в год и это не предел), для

которых опубликовано большинство физико-химических констант. Существующие системы автоматического поиска структуры НС, основанные на идентичности констант НС с константами вещества-свидетеля, находящимися в памяти ЭВМ, ограничены количеством соединений, не превышающих 100-150 тысяч. Естественно, что при таком подходе можно решать только узкие задачи идентификации НС, ограниченные рамками определения принадлежности соединения к конкретному классу - спирты, кислоты и т.д.

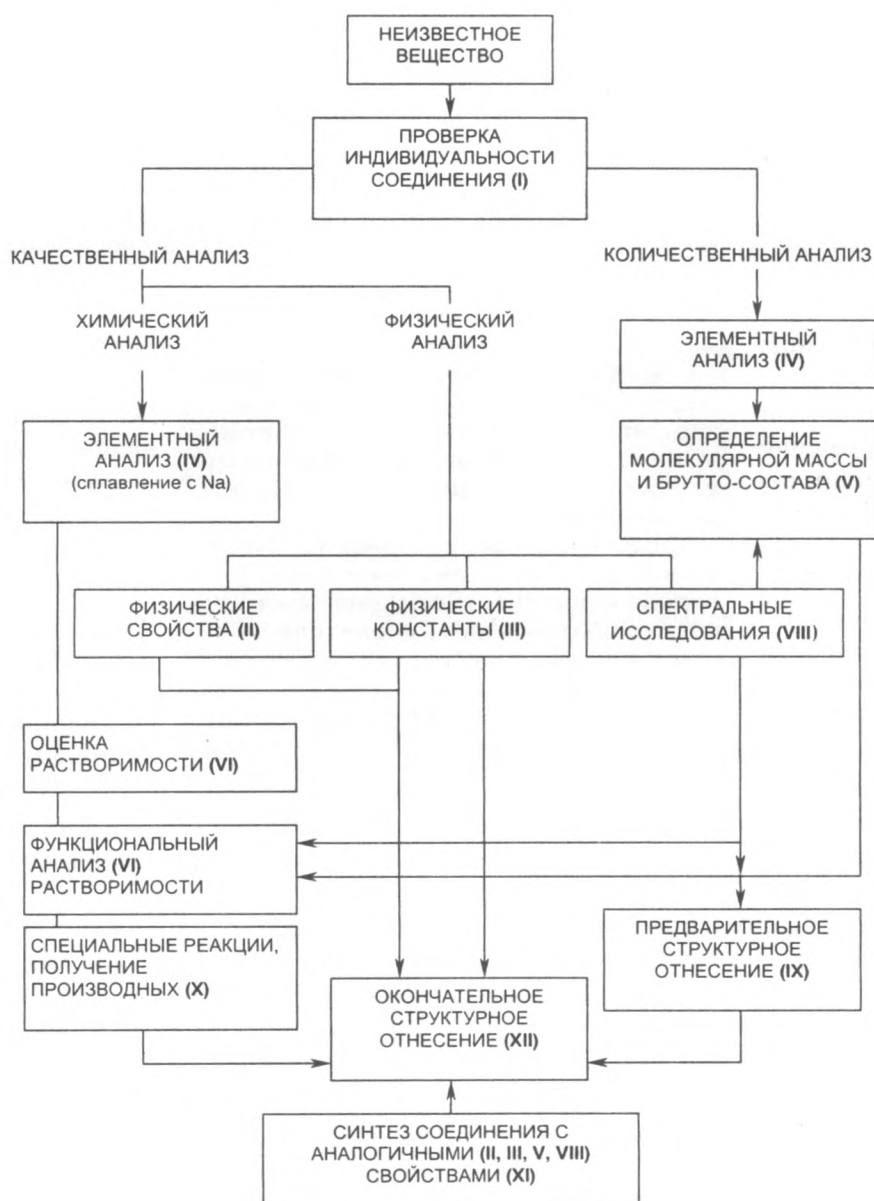


Рис. 1. Схема I идентификации органического соединения

Другим недостатком схемы (Рис. 1) является привлечение большого числа узких специалистов для работы по расшифровке структуры НС.

Глобальные проблемы органического анали-

за (охрана окружающей среды, токсикология, метаболизм лекарственных препаратов, получение высокочистых веществ и др.) требуют развития нового направления в следовом анализе, по-

звляющем производить идентификацию и структурные исследования НС в пределах обнаружения 10^{-4} - $10^{-13}\%$ [5]. В условиях следового анализа предложенная схема (Рис. 1) не работает. Именно методическим вопросам структурной идентификации, проводимой на следовом уровне для НС, посвящен настоящий обзор.

Понятие "неизвестное соединение". В термин НС можно вкладывать различную по степени сложности выполняемого вида анализа нагрузку. В экологической (экотоксикологической), медицинской (судебно-медицинской), фармакологической, ветеринарной и других видах практики фиксируется определенный биологический эффект, причиной которого является НС. В этом случае можно выделить три вида аналитических задач: 1) по картине биологического эффекта можно предполагать химическую структуру (класс) НС. К такому виду следового анализа можно отнести идентификацию изомерных тетра-хлордibenзодоксинов (или дibenзофуранов, дифенилов и т.д.) в различных матрицах (воде, биоте и др.) [6]. В этом случае корректность в определении изомера определяет точное знание его токсического действия [7] (например, фосфорорганические вещества ингибируют ацетилхолинэстеразу); 2) структура определяемого вещества неизвестна, но выявлен биологический эффект, по которому детектируется вещество в течение его выделения из матрицы и в период проведения анализа. К этой категории НС можно отнести биологические активные вещества, выделяемые из культуральных жидкостей и объектов растительного и животного происхождения; 3) неизвестные вещества, выделенные из объектов зарубежного производства или возникающие в результате различных видов физического и другого воздействия (термолиз, пиролиз, фотолиз, биологическая трансформация и др.) на реакционную массу.

Предпосылкой для указанных выше аналитических задач явились достижения в фундаментальных областях спектроскопии (ИК-Фурье, ГЖХ-ИК, ГЖХ-МС низкого и высокого разрешения, ВЭЖХ-МС, различные виды ионизации [8], новые технические приемы в масс-спектрометрии: МС-МС, техника активации соударениями в различных бесполовых областях [9] и др.) и успехи в компьютерной обработке результатов эксперимента [10].

Сущность нового подхода к расшифровке структуры неизвестного соединения. Не отвергая комплексного подхода в распознавании структуры НС, предполагается первоначальный

этап изучения НС проводить с установления молекулярной массы вещества и его брутто-состава. Эти манипуляции требуют использования масс-спектрометра (обычно двухфокусного) с $M/\Delta M$ выше 100000, снабженного источниками с различными видами ионизации. Квадрупольные масс-спектрометры и масс-спектрометры типа "ионная ловушка" малопригодны для этой цели, т.к. ограничены в разрешении и дают частично искаженные масс-спектры (МС), что не позволяет в полной мере использовать атласы и библиотеку в памяти ЭВМ.

На последующих этапах исследования структуры НС, если позволяет количество пробы, происходит уточнение структуры с применением методов УФ-, ИК-спектроскопии, 1H и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и др. [12]. Не исключается использование методов химической модификации [13] для уточнения определенных функциональных группировок в структуре НС и их количества.

Критерием выбора метода масс-спектрометрии как основного для цели определения структуры НС служит:

- универсальность метода (возможность применения для структурного анализа значительного круга объектов, независимо от их агрегатного состояния и степени растворимости);
- его высокие метрологические параметры (предел обнаружения - средний $p.b. = 1 \cdot 10^{-9} \text{ г/г}$, воспроизводимость - средняя 10-15 % относительных);
- оперативность (короткое время анализа и производительность метода).

Требования к анализируемому образцу неизвестного соединения. Главным условием успешного анализа образца НС является его индивидуальность. С точки зрения химика индивидуальным можно считать вещество, дающее одно пятно на хроматограмме в разных системах растворителей (вариации по полярности системы) с величиной смещения зоны R_f в интервале 0,2-0,8 (метод ТСХ). Исследование лучше проводить на пластинках силуфол УФ-254 или Силперл УФ-254, наблюдая люминесценцию пятен при освещении УФ-светом в темноте. Индивидуальным считается твердое вещество, имеющее четкую $T_{пл}$ в пределах $1-2^\circ C$. При перекристаллизации вещества $T_{пл}$ не должна меняться. Для микроколичеств вещества при определении $T_{пл}$ используют столик Кофлера. Жидкость считается индивидуальной, если вещество кипит в пределах $1-2^\circ C$ и не меняет показатель преломления (n_d^{20}) в четвертом знаке и плотность (d_4^{20}) при повторных перегонках.

Однако в следовом анализе эти условия не выполняемы из-за большого расхода анализируемой пробы. Для этой цели используется масс-спектрометрия низкого разрешения с различными источниками ионизации - электронный удар (ЭУ), химическая ионизация положительных и отрицательных ионов (ХИ-ПИ и ХИ-ОИ соответственно), бомбардировка "быстрыми" атомами (ББА) и другие виды ионизации [8, 16, 17].

Совпадение результатов по определению массового числа (m/z) молекулярного иона ($[M]^+$) дает первую аналитическую характеристику НС - его молекулярную массу. Широкий набор методов ионизации необходим для установления конкретного значения массы $[M]^+$, что особенно важно при отсутствии элементного анализа. Например, если в масс-спектре ЭУ видна масса меньшая, чем истинная у соединения (проверка с использованием "мягких" методов ионизации - ХИ, ББА, полевая десорбция (ПД)), то априорно можно предполагать, что НС содержит термолабильные связи - амидные, гликозидные и другие и НС относится к классу пептидов, олигосахаров, органических солей и т.д.

При получении масс-спектра НС определяется температурный интервал (запись полного ионного тока (ΣJ)), при котором происходит съемка, что дает исследователю приблизительную оценку $T_{пл}$ исследуемого вещества. При вакууме 10^{-7} торр температура испарения пробы приблизительно на 100°C ниже $T_{пл}$. Таким образом, если по масс-спектрометрической оценке $T_{пл}$ исследуемого неизвестного вещества лежит ниже $200-250^\circ\text{C}$, то для осуществления контроля за чистотой пробы и получения качественного масс-спектра НС можно использовать хромато-масс-спектрометрию. Количество пробы составляет один мкл. Анализ пробы следует проводить на нескольких колонках с фазами с различной полярностью - карбовакс 20М, SE-30, OV-101, DB-5 и др. Кроме того, масс-спектрометрия позволяет использовать еще несколько методических приемов. Первая манипуляция связана со снижением энергии ионизирующих электронов до величины энергии ионизации (примерно 15 эВ). В этом случае в масс-спектре ЭУ проявляются лишь пики $[M]^+$ или низкоэнергетические перегруппировочные ионы. Другой прием связан с изучением масс-спектров метастабильных ионов, полученных техникой DADI (или MIKES) - для масс-спектров с "обратной" геометрией. Метастабильные спектры получают последовательно от $[M]^+$ и затем от осколочных ионов. Этот прием является необходимым и в дальнейшем, т.к. достоверно определяет после-

довательность фрагментации $[M]^+$ и осколочных ионов.

Определить ионы, возникновение которых обусловлено примесью, можно, используя запись ионных токов осколочных ионов в режиме масс-фрагментографии, ведя непрерывное сканирование масс-спектров в условиях линейно-программированного подъема температуры испарения пробы [18, 19].

Еще более желательным (в случае имеющегося tandemного масс-спектрометра - система MS-MS) является использование камеры соударений во втором бесполом пространстве для выбранных ионов НС [9]. Поступающие в камеру ионы с определенным значением m/z при столкновении с молекулами применяемого газа распадаются, давая собственный масс-спектр. Этот прием позволяет проследить логическую связь между всеми ионами неизвестного вещества и отбросить (отсортировать) ионы, появление которых обусловлено примесью. Система MS-MS универсальна в отличие от хроматографии, где ограничивающим фактором является летучесть образца, правильность выбора фазы или система элюантов при комбинации ВЭЖХ с масс-спектрометром, где интерфейс - термоспрей (термоструйная распылительная ионизация) или плазмоспрей.

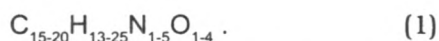
Таким образом, использование масс-спектрометрии на начальных стадиях эксперимента по расшифровке структуры НС позволяет обходиться без привлечения хроматографических методов в оценке индивидуальности анализируемого образца и проводить работу на следовом уровне.

Структурная информация, поступающая из первичных масс-спектрометрических данных.

Результаты, полученные из масс-спектрометрического эксперимента, позволяют сделать следующие предварительные выводы о структуре НС:

1. Установить истинную мол. массу неизвестного вещества, фиксируя одно и то же значение m/z для пика $[M]^+$ в различных условиях ионизации.
2. Четная масса $[M]^+$ свидетельствует о четном числе атомов азота в изучаемой молекуле - атомов $N=0, 2, 4, 6$ и т.д. ("азотное" правило).
3. "Мультиплетность" $[M]^+$ определяет возможное число атомов Cl, Br, S, Si в брутто-составе молекулы.
4. Найденная изотопная поправка для $[M]^+$ соответствует приблизительно числу атомов C в брутто-составе молекулы (природный изотоп ^{13}C равен 1,107). Ошибка в определении числа C составляет ± 2 атома [20].

На основании полученных данных по указанным выше четырем пунктам дается предварительная оценка примерного качественного и количественного брутто-состава исследуемой молекулы. Например, НС согласно данным масс-спектрометрии дает пик $[M]^+$ с m/z 295 (95)*, его изотопные пики - с m/z 296 и 297 имеют соответственно интенсивность 18 и 1 %. Отсюда следует вывод, что число атомов азота в молекуле нечетное, в ее составе отсутствуют элементы S и Si, а число атомов C примерно равно 17. Тогда брутто-состав неизвестного вещества можно описать следующей формулой (1): $(12_C \times 17) = 204$, $14_N \cdot 3 = 42$, $16_O \cdot 2 = 32$, и $1_H \cdot 17 = 17$. Исходя из предельного количества атомов водорода для 17 атомов C и учетом возможных гетероатомов, можно выбрать пределы каждого элемента, ввести их в ЭВМ для последующей съемки масс-спектров высокого разрешения (МСВР):



Второй этап рассмотрения масс-спектров неизвестного вещества включает оценку интенсивности $[M]^+$, величины стабильности $[M]^+$ к ЭУ (W_M) и значения селективности ($S_{1/2}$) масс-спектра [20]. Обычно 100 %-ная интенсивность $[M]^+$ и значение W_M , лежащее в пределах 10-30% от ΣJ , а также высокая селективность спектра $S_{1/2}$ (в пределах 3-6) свидетельствуют о том, что вещество обладает ароматическим характером. Наличие в масс-спектре интенсивного пика двузарядного $[M]^{2+}$ позволяет отнести структуру к π -донорным (азолы) или к π -акцепторным ароматическим системам (азины) [22]. Высокая интенсивность иона $[M-H]^+$ в масс-спектре ХИ-ОИ и средняя интенсивность того же иона $[M+H]^+$ в масс-спектре ХИ-ПИ свидетельствуют о высоком сродстве молекулы (атомов в молекуле) к электрону [23]. Можно полагать, что исследуемая молекула будет содержать много электроотрицательных атомов: Cl, O, NO_2 и др. Знание путей фрагментации $[M]^+$ и осколочных ионов (по спектрам DADI или с помощью техники МС-МС) позволяет сделать заключение о характере заместителей или целых группировок в структуре неизвестного вещества. Например, элиминирование частицы в 19 а.е.м. дает однозначный ответ в пользу присутствия атома фтора в составе молекулы. Отрыв частицы в 16 а.е.м., как правило, характеризует N-окиси. Фиксирование в масс-спектре электронного удара ионов $[M-30]^+$ и $[M-46]^+$ специфично для нитросоединений.

Таким образом, применение масс-спектрометрии на первом этапе позволяет получать струк-

турную информацию для НС на следовом уровне, которую не дает ни один из методов.

Использование данных масс-спектров высокого разрешения. МСВР позволяют измерять массу иона с точностью до $\pm 0,005-0,00005$ а.е.м. в зависимости от возможностей прибора. МСВР могут быть получены для веществ в условиях ионизации ЭУ, ХИ-ПИ, ХИ-ОИ и ББА и даже в режиме ХМС эксперимента. Таким образом, приобретение количественной информации о брутто-составе $[M]^+$ и осколочных ионов возможно как для термолabileльных, так и полярных соединений. Ранее такой эксперимент не был доступен. МСВР могут быть измерены фактически для всех ионов, имеющих в масс-спектре НС.

Продолжая интерпретацию структуры НС с m/z 295, провели измерения точных масс для $[M]^+$ и ряда осколочных ионов. Для $[M]^+$ точная масса равна 295, 1348 ($M/\Delta M = 10000$). Вкладывая в компьютер параметры формулы (1), найденные ранее из масс-спектра низкого разрешения, получаем следующие варианты брутто-молекул неизвестного соединения (Табл. 1).

Таблица 1

Формула (2)

Измерено:	Ошибка	Элементы и их число			
	Δ	C	H	N	O
295,1348	2,7	17	17	3	2
	3,5	19	19	0	3

Из двух возможных вариантов последний вариант формулы (2) не корректен, т.к. НС имеет нечетную мол. массу. Отсюда следует единственный вывод - брутто-состав НС описывается формулой - $C_{17}H_{17}N_3O_2$

Далее рассматриваем первичные осколочные ионы. Масс-спектр метастабильных ионов (DADI) указывает на прямой отрыв частицы в 73 а.е.м. от $[M]^+$. МСВР, измеренный для осколочного иона с m/z 222, показывает точную массу, равную 222, 1014. ЭВМ дает следующий вариант возможных структурных формул для этого осколочного иона (Табл.2):

Таблица 2

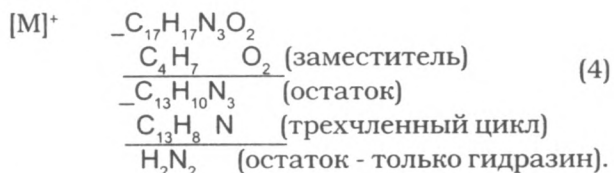
Формула (3)

Измерено:	Δ	C	H	N	O	Элиминируемые осколки
222,1014	-1,7	14	12	3	0	$C_3H_5O_2$
	-3,0	16	14	0	1	CH_3N_3O
	1,0	11	14	2	3	вариант не корректен

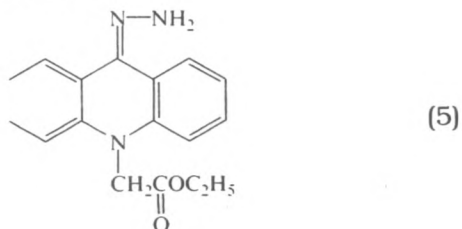
* В скобках указана относительная интенсивность (к J_{max} в масс-спектре) пика иона

В этом случае последний вариант не корректен, т.к. изначальная брутто-формула данного соединения не содержит трех атомов кислорода. Трудно представить структуру остатка при прямом элиминировании частицы $\text{CH}_3\text{N}_3\text{O}$ из $[\text{M}]^+$. Поэтому можно предположить, что первый вариант наиболее реален и элиминируемый фрагмент будет иметь следующие структурные формулы: $\text{C}_2\text{H}_5\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, или $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(=\text{O})-$, или $\text{CH}_3\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2-$, или $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2-$. Известно, что кетоны и сложные эфиры имеют тенденцию к разрыву α -связи относительно карбонильной группы, поэтому две последние структуры не реальны (нет в масс-спектре ионов $[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$ или $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CO}]^+$). В дальнейшем, используя метастабильные спектры и данные МСВР, можно сделать следующие выводы: $[\text{M}]^+$, m/z 295 \rightarrow m/z 280 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 295 \rightarrow m/z 267- $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ (перегруппировка Мак-Лафферти), 295 \rightarrow m/z 251- $[\text{M}-\text{OC}_2\text{H}_4]^+$, m/z 295 \rightarrow 222 - $[\text{M}-\text{COOC}_2\text{H}_5]^+$ и m/z 295 \rightarrow m/z 208- $[\text{M}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5]^+$. В итоге заместитель имеет структуру: $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$. Дополнительно из спектра низкого разрешения следует: m/z 77- $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$, m/z 152- $[\text{бифенилен}]^+$, видны групповые характеристики ароматических соединений: m/z 77 и 152, трицикла - m/z 165 и известен заместитель.

В итоге проведенного анализа с НС имеем следующую картину:



С учетом данных УФ-спектроскопии, как вспомогательного метода для НС получены следующие характеристики ($\lambda_{\text{макс}}$ ($\lambda_{\text{г}}\Sigma$)): 232(4.74), 292(3.90), 373(3.94). Анализ полос поглощения показывает, что УФ-спектр не отвечает трехчленной структуре типа бензохинолина (акридина), а похож на трехчленную структуру хинойного типа. Совокупность приведенных и проанализированных данных предполагает возможность существования лишь одной структуры для НС: 9-гидразиноминно-10-карбэттооксиметилакридана (только акридановая структура может обеспечить появление ионов с m/z 152 и 165).



Использование дополнительных методов. Из приведенного примера видно, какими структурными возможностями обладает только один метод масс-спектрометрии, оснащенный современной техникой. Однако следует признать, что в этом случае нам необходим дополнительный независимый контроль, позволяющий корректировать интерпретацию. При анализе НС необходимо учитывать визуальные характеристики: фазовое состояние вещества, его цвет и запах. Сопоставляя внешние признаки со знанием брутто-состава НС, можно мысленно отвергнуть целый ряд структурных вариантов. Например, в отсутствие цвета для соединений с большой молекулярной массой можно с достаточной степенью вероятности предполагать наличие многокольчатых циклоалкановых структур - типа стероидных. Наоборот, глубокое окрашивание НС при фиксировании в масс-спектре ЭУ незначительных по массе (<200 а.е.м.) ионов свидетельствует в пользу комплекса органического лиганда с металлом. Визуальные характеристики не требуют расхода пробы. В случае, когда количество НС достигает 0,1 г, возможно применение большинства спектральных методов (возможно избирательное применение). Методы УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии дают проверяющую и уточняющую информацию и характеристики, что заметно повышает достоверность получаемой структурной информации.

С учетом высказанных выше пожеланий схема II идентификации НС должна выглядеть следующим образом (Рис.2).

Расшифровка структуры с привлечением ЭВМ. В рамках автоматизации научных исследований ставится задача ускорения и облегчения интерпретации спектроскопических данных, в частности результатов масс-спектрометрического эксперимента.

В настоящий момент для автоматизированной расшифровки масс-спектров применяются три подхода:

- 1) использование аддитивных свойств при интерпретации молекулярной массы с применением четырнадцатиричной системы счисления массовых чисел и выявление гомологической серии;
- 2) использование библиотеки данных полных масс-спектров (поиск с помощью ЭВМ);
- 3) использование системы искусственного интеллекта, в котором данные масс-спектрометрии служат органичным дополнением к результатам, получаемым из других видов спектроскопии.

Критически рассмотрим возможности каждо-

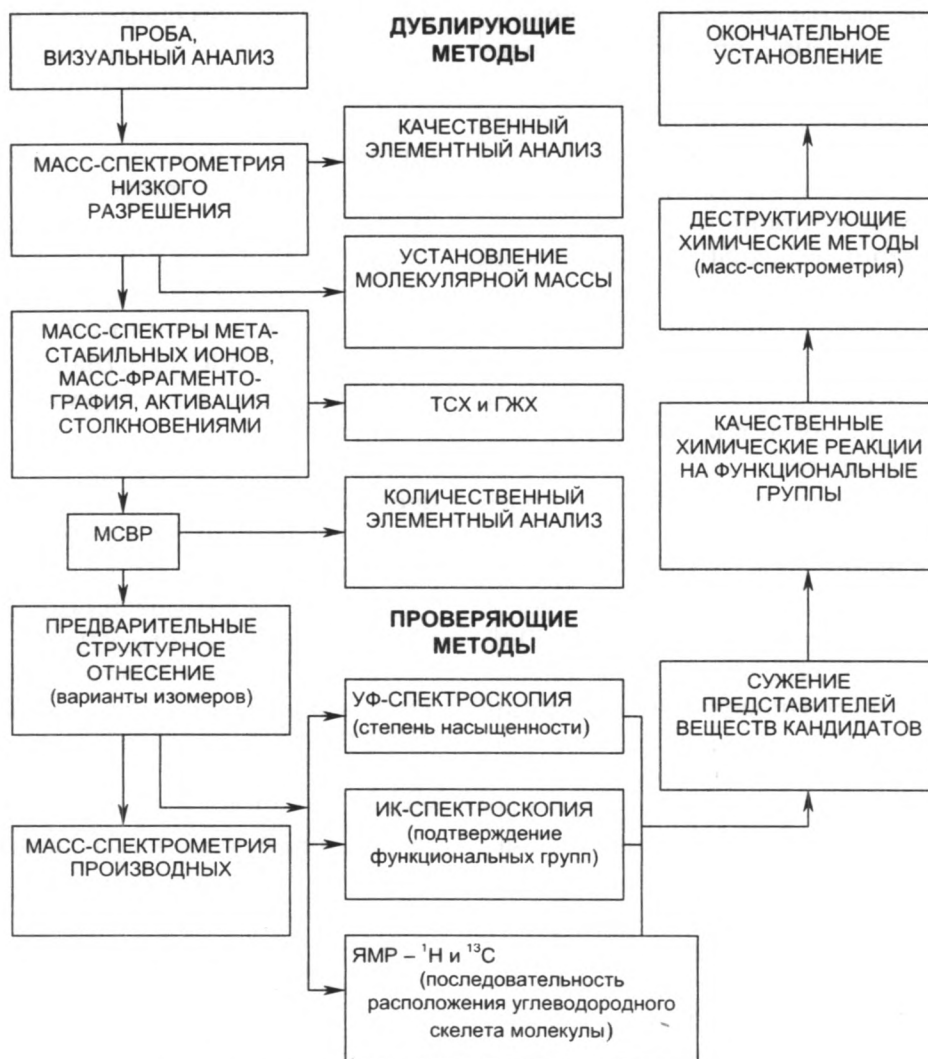


Рис. 2. Схема II идентификации неизвестного соединения

го подхода в решении задачи по установлению строения НС.

Первый подход развивался в нашей стране усилиями Зинкевича И.Г. и Иоффе Б.В. [24,25]. Прототипом этого метода служит классификация органических соединений по масс-спектрам ионных серий. Этот прием ранее широко использовался в структурно-групповом анализе [21]. Пользуясь различными видами гомологии в органической химии, любое массовое число, в том числе и $[M]^+$, можно записать в виде функции $M=f(X,Y)$, где X и Y - целые числа, в свою очередь полученные через функцию $X=E(M/14)$ и $Y=M-14E(M/14)$, где E - функция, означающая часть числа. Все многообразие химических соединений в этом случае подразделено на 14 крупных таксономических категорий ($0 \leq Y \leq 13$). Ясно, что заключить все многообразие органических веществ в 14 групп невозможно (напр., в гомологическую группу 1 входят алканы, нафталины, кетоны и т.д.). Подобный подход имеет успех лишь

при интерпретации простых соединений, но не полифункциональных веществ.

Наличие системы библиотечного поиска у исследователя полностью заменяет разработанный подход. Предложенная система интерпретации не делает выбора между изомерами [18, 19], она не учитывает возможностей специфических перегруппировочных процессов (напр., “явление орто-эффекта” в масс-спектрометрии), протекающих в условиях ионизации ЭУ. Эта система не использует всей информации, поставляемой масс-спектрометрическим экспериментом - исключает другие виды ионизации, спектры метастабильных ионов, двузарядные ионы и др. В ее основе заложено лишь значение массового числа и его интенсивность ($J \geq 10\%$ от $J_{\text{масс}}$). Негативной стороной “библиотечного поиска” является то, что в масс-спектр НС попадают пики ионов от фазы хроматографической колонки, которые учитываются при сравнении полученного спектра с масс-спектром из библиотеки.

Учитывая факт невозможности прогнозирования масс-спектра (решение обратной спектральной задачи из-за отсутствия строгой теории в описании масс-спектра), многие исследователи идут по пути создания банков масс-спектров. Такие базы данных имеются в нашей стране и за рубежом (например, в Англии - центр масс-спектрометрических данных находится под руководством Министерства обороны Aldermaston, Reading, Berks). К 1985г. банк содержал 1,2 млн. структур и около 5 млн. сведений об их свойствах, реакциях и области применения (пакетный режим и теледоступ [26,27]). Годовой объем базы - 300 тыс. сведений о структуре в год.

В научно - информационном центре по молекулярной спектроскопии НИОХа (Новосибирск) создана система "Компас-МС", базирующаяся на машинной библиотеке полных масс-спектров и структуры органических соединений (~25000 масс-спектров). Система оперирует с несколькими файлами и построена по модульному принципу, что позволяет легко расширять ее путем добавления новых программ и файлов. Эта система может давать информацию по массовым числам и их интенсивности, вести статический анализ масс-спектров, обладающих заданными структурными особенностями, с целью выявления общих спектральных признаков. База данных занимает 17 Мбайт внешней памяти [28, 29, 30]. Возможности таких программ также ограничены, прежде всего незначительностью информации в самом банке (10 млн. органических соединений - см. выше). Следует также отметить, что искажение МС-ЭУ, полученное в режиме хромато-масс-спектрометрии (ХМС), по сравнению с МС-ЭУ, зарегистрированного при прямом вводе пробы в ионный источник масс-спектрометра, также понижает результативность интерпретации по библиотечному поиску [31].

Наиболее перспективным направлением поиска структуры неизвестного соединения является построение интерпретирующей системы искусственного интеллекта. Ее реализуют на базе данных молекулярной спектроскопии (комплекса данных - программы РАСТР, МАИСС) [31]. Для реализации такой системы необходимо решить четыре типа задач: 1) выявление структуры молекулы; 2) интерпретация молекулярного спектра; 3) прогнозирование спектра и 4) поиск структурной информации. Выше мы уже обсуждали вопрос о том, что прогнозирование масс-спектра в отсутствие теории его образования не корректно. Интерпретация масс-спектра без данных масс-спектрометрии высокого разрешения

и метастабильных спектров также невозможна. Роль масс-спектрометрии в системе искусственного интеллекта в настоящий момент ограничена и сведена к роли естественного фильтра, ограничивающего число рассматриваемых вариантов структурных формул. За рубежом, однако, существуют системы искусственного интеллекта для распознавания структуры на основе масс-спектрометрической информации. Наибольшую известность получили системы "DENDRAL", "STIRS" и "CHEMIC" [31]. Программы рассчитаны на расшифровку структур у НС с мол. массой не более 300 а.е.м.

Слабость автоматизации процессов структурной идентификации НС на сегодняшний день не должна вселять пессимизм у исследователя, т.к. за этим направлением - будущее.

Примеры использования предложенной методики установления структуры.

Представлены результаты по интерпретации данных, полученных при установлении строения НС (XIII), которая установлена при расщеплении молекулы неизвестного состава при обработке $N(Bu)_4^+OH^-$ в ДМСО. Эта часть молекулы получила название батуминовой кислоты [32].

Из масс-спектров полевой десорбции (МСПД) и МСВР была определена молекулярная масса (М.м.) и брутто-состав (XIII). МСПД показал, что максимальная М.м. (XIII) не выше 347 а.е.м. - проявляется пик протонированного молекулярного иона $[M+H]^+$ с m/z 347. МСВР определил брутто-состав (XIII) - $C_{22}H_{34}O_3$ (найдено 346, 2519, рассчитано 346, 2508).

Прежде всего необходимо было выявить функциональные свойства трех атомов кислорода в структуре молекулы (XIII) (рис.3).

Батуминовая кислота обрабатывалась эфирным раствором диазометана с образованием продукта (XIV), а также смесью анилина, дициклогексилкарбодиимида и 4-диметиламинопиридина в среде ацетона с выделением продукта (XV). В полученных соединениях (XIV) и (XV) были зафиксированы пики $[M]^+$ с m/z 360 и 421 соответственно. Их брутто-состав, согласно данным МСВР, соответствовал $C_{23}H_{36}O_3$ (найдено 360, 2647, рассчитано 360, 2664) для соединения (XIV) и $C_{28}H_{39}NO_2$ (найдено 421, 2974, рассчитано 421, 2981) для соединения (XV).

Получение метилового эфира (XIII) (соединение XIV) и анилида (XIII) (соединение XV) свидетельствовало о наличии карбоксильной группировки в структуре молекулы (XIII). Это подтверждает и характер фрагментации $[M]^+$ соединения (XIV). В масс-спектре (XIV) фиксируются ионы с

m/z 329 - $(M-OCH_3)^+$, 301 - $(M-COOCH_3)^+$ и 300 - $(M-HSOOCH_3)^+$ - типичные для диссоциативной ионизации жирных кислот.

Таким образом, два атома кислорода из состава (**XIII**) входят в функциональную карбоксильную группировку. Относительно третьего атома кислорода можно предположить, что он входит в

состав концевой метилкетонной группировки, учитывая путь выделения (**XIII**) путем реакции ретроальдольного расщепления антибиотика неизвестного состава.

Для подтверждения этого предположения провели восстановление (**XIII**) в этаноле боргидридом натрия (рис.3).

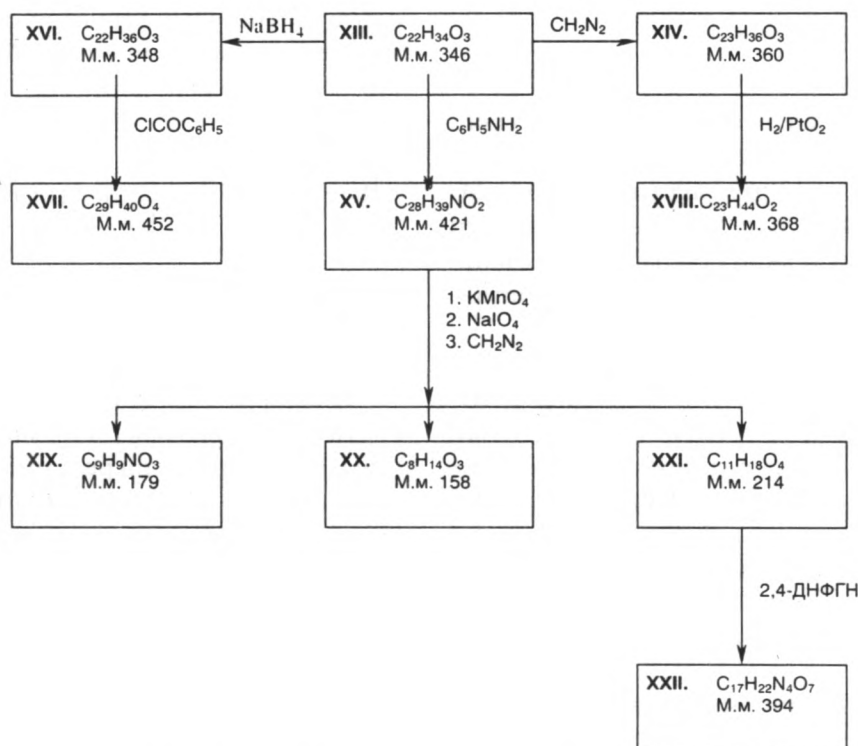


Рис. 3. Схема выявления функциональных свойств

В масс-спектре соединения (**XVI**) зарегистрировали пик $[M]^+$ с m/z 348. Последовательное отщепление двух молекул H_2O из $[M]^+$ соединения (**XVI**) - пики ионов с m/z 330 и 312 - подтверждало наше предположение о том, что концевым фрагментом молекулы (**XIII**) является метилкетонная группировка (элиминирование одной молекулы воды связано с карбоксильной группой в соединении (**XIII**)). Действительно, в масс-спектре продукта (**XIII**) были видны ионы с m/z 43 - $(COOH_3)^+$ и m/z 303 - $(M-COCH_3)^+$. Дополнительно продукт (**XVI**) был бензоилирован (соединение **XVII**) хлористым бензоилом в среде пиридина и ацетона. Измеренное точное значение массы для $[M]^+$ соединения (**XVII**) показало брутто-состав $C_{29}H_{40}O_4$ (найденно 452, 2907, рассчитано 452, 2916). Исходя из этих данных строение батуминовой кислоты можно представить структурой:

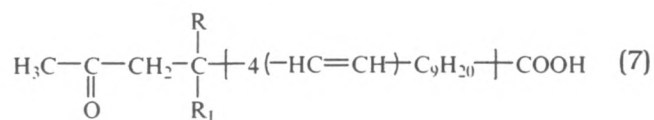


Найденная на основании МСВР эмпирическая формула соединения (**XIII**) $C_{22}H_{34}O_3$ указывает на наличие 6 инкрементов ненасыщенности в исследуемой молекуле, два из которых приходилось на карбонильную и карбоксильные функции. Чтобы решить вопрос о количестве π -связей в соединении (**XIII**), этанольный раствор (**XIV**) гидрировали водородом в присутствии PtO_2 . Зарегистрированный пик $[M]^+$ соединения (**XVIII**) (схема 3) имеет m/z 368 (октагидропроизводное XIV), что автоматически доказывает содержание четырех гидрируемых $C=C$ -связей в продукте (**XIII**).

Обнаруженное прямое элиминирование молекулы ацетона из $[M]^+$ соединения (**XIII**) (доказано техникой DADI), происходящее с миграцией атома водорода по механизму перегруппировки Мак-Лафферти, с большой очевидностью свидетельствует о месте разветвления углеводородной цепи в молекуле (**XIII**), т.к. в процессе отщепления ацетона из $[M]^+$ - процесс более интенсивный (найденно 288, 2047, рассчитано для формулы $C_{19}H_{28}O_2$

- 288, 2089), чем элиминирование ацетильного остатка (m/z 303).

Совокупность этих данных дает основание предположить, что структура соединения (**XIII**) описывается формулой:



где R, R₁ - H или CH₃.

Дальнейшее рассмотрение масс-спектра продукта (**XIII**) показывает (техника DADI), что вторичные процессы фрагментации иона [M-CH₃COCH₃]⁺ связаны с элиминированием частиц CH₃ и C₂H₅. Поэтому можно утверждать, что один из заместителей R или R₁ (формула (7)) представляет собой H, другой является CH₃ группой.

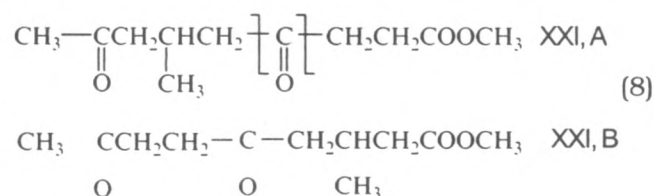
Таким образом, остается нерешенным вопрос о расположении π-связей в углеводородной центральной части молекулы (**XIII**). Поэтому нами было проведено окислительное расщепление двойных связей в соединении (**XV**) по методу Лемье-Рудольфа. Удалось выделить три кислоты, которые были переведены в соответствующие метиленовые эфиры для получения высокоинтенсивных пиков [M]⁺ в условиях электронного удара (рис.3).

Первая из них (соединение (**XIX**)) дает в масс-спектре пик [M]⁺ с m/z 179 и имеет брутто-состав C₉H₉NO₃ (найденно 179, 0573, рассчитано 179,0580). Фиксация в масс-спектре осколочных ионов (брутто-состав которых подтвержден данными МСВР) с m/z 120-[M-COCH₃]⁺, 92-[NHC₆H₅]⁺, 59-[H₃COCO]⁺ однозначно указывает структуру соединения (**XIX**), представленную как метиловый эфир моноанилида щевелевой кислоты.

Метиловый эфир второй кислоты (**XX**) дает в масс-спектре пик [M]⁺ с m/z 158. Его брутто-состав по данным МСВР - C₈H₁₄O₃ (найденно 158, 0926, рассчитано 158, 0943). Характер его фрагментации, рассмотренный с помощью МСВР и спектров метастабильных ионов, доказывает строение продукта (**XX**) - метиловый эфир 3-метил-5-кетогексановой кислоты. В масс-спектре (**XX**) фиксируются осколочные ионы с m/z 127-[M-OCH₃]⁺, 101-[M-CH₂COCH₃]⁺, 100-[M-CH₃COCH₃]⁺, 99-[M-COCH₃]⁺, 85-[M-CH₂COOCH₃]⁺, 74-[CH₃COOCH₃]⁺, 58-[CH₃COCH₃]⁺. Для ионов с m/z 100, 74 и 58 миграция водорода осуществлялась в соответствии с перегруппировкой Мак-Лафферти.

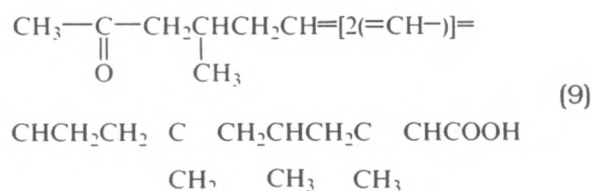
Третий метиловый эфир кислоты (**XXI**) имел [M]⁺ с m/z 214. Его брутто-состав C₁₁H₁₈O₄ (найденно 214, 1217, рассчитано 214, 1205). Из четырех

атомов кислорода, входящих в состав молекулы (**XXI**), два атома принадлежат карбоксильной группе, а два - кетонной. Этот вывод следует из общих положений фрагментации ациклических кетонов (α-разрыв относительно карбонильных групп). В масс-спектре (**XXI**) фиксируются осколочные ионы с m/z 71, 87, 99, 115, 127, 143, образование которых может быть обусловлено двумя альтернативными структурами А и Б (нами принималась во внимание способность алифатических осколочных ионов дегидрировать в условиях ионизации),:



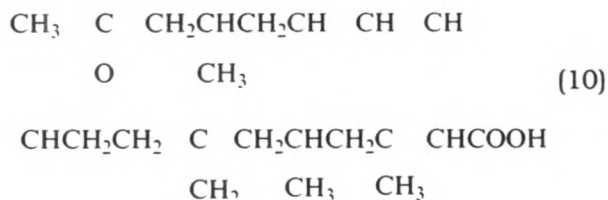
Чтобы решить, какая из двух предложенных структур является верной, мы получили основание Шиффа, проведя реакцию соединения (**XXI**) с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГН) - (см. рис.3). Было выделено вещество (**XXII**) с М.м. 394 (МСВР: найдено 394, 1496, рассчитано для C₁₂H₂₂N₄O₇ - 394, 1489). Из полученных данных следовало, что реакция осуществляется лишь по одной кето-группе. Первичным актом элиминирования из [M]⁺ является отщепление частицы в 87 а.е.м. состава C₄H₇O₂ (найденно 307, 1021, рассчитано для C₁₃H₁₅N₄O₅ - 307, 1043). Фиксация осколочных ионов с m/z 279 состава C₁₂H₁₅N₄O₄ (МСВР) и m/z 115 состава C₅H₇O₃ (МСВР) строго доказывает положение карбонильной группировки, не вступившей в реакцию с 2,4-ДНФГН. Отсюда следует вывод, что метиловый эфир последней из трех кислот имеет строение (**XXI, A**) - метилового эфира 6-метил-4,8-дикетононановой кислоты.

Проделанный путь дериватизации и деструкции соединения (**XIII**) позволил установить строение структурных фрагментов этого продукта и описать его следующей формулой:



Два оставшихся метиленовых атома углерода, исходя из структурной формулы соединения (**XIII**), можно расположить, лишь образуя сопряженную диеновую группировку. Отсюда следует,

что батуминовая кислота имеет строение 3,5,15-триметил-7-метилден-17-кето-2,10,12-триеноктановой кислоты:



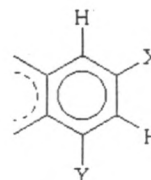
Проведенное масс-спектрометрическое исследование гарантирует структуру батуминовой кислоты (формула (10)) без учета ее пространственного строения.

Второй пример связан с расшифровкой формулы НС (количество 0,5 г) неизвестного происхождения. НС представляет собой желтовато-оранжевый кристаллический порошок без запаха. Индивидуальность рассматриваемого соединения проверялась с помощью метода ТСХ (в бензоле - $R_f=0.2$; в CHCl_3 $R_f=0.24$; на пластинках Silufol UV -254 ЧССР, обнаружено в УФ-свете). Видимых примесей не обнаружено.

По данным элементного анализа, НС имеет: С-66,10, Н-4,36, N-11,44 и О-18,10 (при $n=4$ брутто-состав $\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_7$). Как видно, данные элементного анализа неоднозначны. В УФ-спектре проявляются следующие полосы поглощения (раствор в MeOH): нейтральная среда - $\lambda_{\text{макс}}$ ($\lambda_{\text{гс}}$) -219 нм (4,19), 278-286 нм (4,15), 370-380 нм (4,11). Аналогичный УФ-спектр получен при подкислении раствора. При подщелачивании раствора возникла дополнительная широкая полоса поглощения с $\lambda_{\text{макс}}$ около 450 нм (3,91). В ИК-спектре наблюдались следующие полосы поглощения (см^{-1}): 3450 (широкая), 3320 (широкая), 3220 (широкая) - все $\lambda_{\text{(втор.амин)}}$ или $\lambda_{\text{(CONHR)}}$, не исключено присутствие ОН-группы фенольного типа; 3060 - $\lambda_{\text{CHаром.}}$; 2920 и 2840 - (слабые) - $\lambda_{\text{N-CH}_3}$; 1650 - $\lambda_{\text{амид}}$ или λ_{CO} (хиноидный); 1600, 1490, 1430 (сильные) - колебания ароматического ядра, не исключается наличие связи $\lambda_{\text{C=N}}$ в ароматическом цикле; 1543 и 1333 (сильные) - λ_{NO_2} ; 1395, 1170, 1145, 1089, 1010, 790, 765, 730, 700 (деформационные полосы при 765 и 730 см^{-1} указывают на 1,3-замещение бензольного ядра).

В спектре ПМР (растворитель ДМСО- d_6 , стандарт ТМС, δ -шкала) регистрируются сигналы ароматических протонов: сложные мультиплеты в области 7,0-8,2 м.д. и два дублета с химическими сдвигами 8,98 и 8,92 м.д. и мета-константой спин-спинового взаимодействия $J=2,9$ Гц. В слабом поле спектра наблюдаются уширенные сиг-

налы двух протонов NH-групп с химическими сдвигами 10,92 и 10,87 м.д. При повышении температуры образца до 80°C происходит смещение этих сигналов в сильное поле, сдвиги соответственно уменьшаются до 10,67 и 10,73 м.д. Значения хим. сдвигов и константы спин-спинового взаимодействия дублетов АВ-системы свидетельствуют о наличии в молекуле анализируемого соединения структурного фрагмента, в котором Х и У - электронно-отрицательные заместители.



Интегральная интенсивность сигналов в спектре ПМР соответствует наличию в молекуле 21 ± 2 атомов водорода.

Совокупность спектроскопических данных не позволяет сделать даже приблизительный вывод о структуре НС. Вместе с тем вносятся противоречивые показания: по спектрам ^1H -ЯМР мы имеем 21 ± 2 атомов Н, а по ^{13}C -ЯМР видны 34 сигнала (сравните с данными анализа); по УФ-спектру батохромное смещение при подщелачивании указывает на ОН-группу, а ИК-спектр - реальное существование амидных связей.

В масс-спектре ЭУ регистрируется пик $[\text{M}]^+$ с m/z 478 (рис.5). Найденная экспериментальная изотопная поправка 31,84 % и 30,89 % (из двух измерений) соответствует 28 или 29 атомам С. Четное массовое число $[\text{M}]^+$ указывает на четное число атомов азота в составе исследуемой молекулы ("азотное правило"). Таким образом, брутто-состав $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_5$, равный 481 а.е.м., ближе всего соответствует масс-спектрометрическим данным. В масс-спектрах ХИ-ОИ и ХИ-ПИ регистрируется соответственно ион $[\text{M}-\text{H}]^+$ с m/z 477 и $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 479. Эти данные позволяют утверждать, что молекула НС имеет молекулярную массу 478 а.е.м.

Общая картина фрагментации НС выглядит достаточно селективной (Рис.5), что предполагает возможность строения исследуемого соединения в виде отдельных арильных или гетерильных блоков (фрагментов), соединенных между собой или непосредственно через С-С межъядерную связь или через гетероатом, не содержащий алкильных заместителей согласно данным ЯМР.

Для пика $[\text{M}]^+$ было измерено точное массовое число - 478,1300, что с учетом ошибки ($\Delta=2,3$) соответствовало брутто-составу $\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$ (табл.3).

Таблица 3

Масс-спектр высокого разрешения неизвестного соединения

Ион	Измеренное точное значение массы	Ошибка Δ	Брутто-состав иона	Вывод
$[M]^+$	478,1300	2,3	$C_{27}H_{18}N_4O_5$	
$[M-33]^+$	445,1161	-2,7	$C_{28}H_{17}N_2O_4$	Примесь
		3,8	$C_{27}H_{17}N_4O_1S_1$	Примесь
$[M-34]^+$	444,1141	3,1	$C_{28}H_{16}N_2O_4$	Примесь
		-2,9	$C_{28}H_{18}N_3O_1S_1$	Примесь
$[M-107]^+$	371,0346	3,2	$C_{22}H_{11}O_4$	Примесь
$[(M-34)-73]^+$		3,3	$C_{22}H_{13}N_1O_1S_2$	Примесь
$[M-142]^+$	336,0660	3,9	$C_{17}H_{10}N_3O_5$	
$[M-176]^+$	302,0544	3,0	$C_{18}H_{10}N_2O_1S_1$	Примесь
		-3,5	$C_{19}H_{10}O_4$	Примесь
		-2,1	$C_{17}H_8N_3O_3$	Примесь
$\Phi, [(M-142)-NO_2]^+$	290,0663	-2,8	$C_{17}H_{10}N_2O_3$	
$[\Phi-NO_2]^+$	244,0731	-3,1	$C_{17}H_{10}NO$	
$[(\Phi-NO_2)-CON]^+$	215,0738	0,3	$C_{16}H_9N_1$	
	143,0718	-1,7	$C_{10}H_9N_1$	
	115,0554	0,6	C_9H_7	

Как следует из данных МСВР, пики осколочных ионов с m/z 445, 444, 371 и 302 принадлежат другому веществу (примеси). Действительно, отрыв частиц в 33 и 34 а.е.м. из $[M]^+$ может быть связан лишь с отщеплением частиц SH или SH₂, но элементный анализ не обнаружил следов серы.

Для уточнения факта присутствия примеси в образце и выяснения механизма фрагментации использовались спектры метастабильных ионов. Нами была применена техника DADI. Дополнительно проведено исследование с помощью ВЭЖХ. Детектирование осуществлялось при трех длинах волн: 280 нм, 370 нм и 411 нм (по данным УФ-спектроскопии) для НС. Было обнаружено две примеси с временем выхода ($t_{мин}$) с колонки - 2,18 и 4,18. Основное вещество имеет $t_{мин}$, равное 4,90.

Было показано с помощью метастабильных спектров, что направления распада $[M]^+ \rightarrow m/z$ 444 и $[M]^+ \rightarrow m/z$ 371 не существует. Картина фрагментации НС описывается следующей схемой (рис. 4).

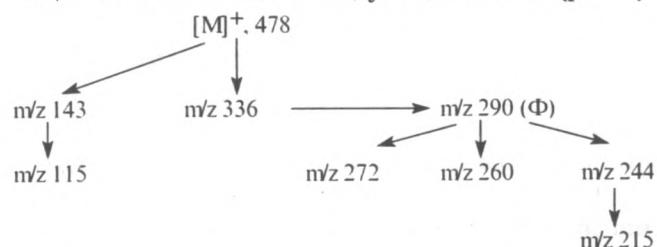
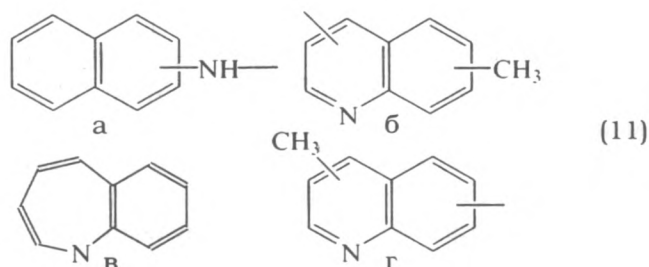


Рис.4. Схема фрагментации неизвестного соединения

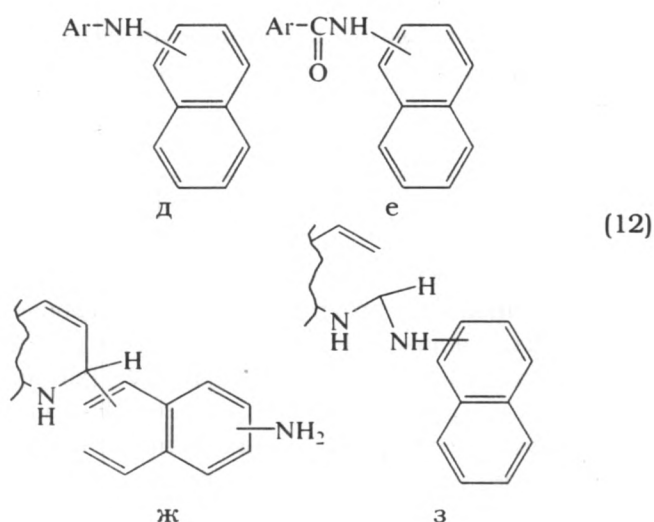
Таким образом, ионы с m/z 445, 444, 371 и 302 принадлежат не НС, а его примеси (присутствие примеси подтвердилось спектрами ¹³C-ЯМС и ВЭЖХ, но не было обнаружено ТСХ).

Как следует из масс-спектров метастабильных ионов, на первом этапе фрагментации $[M]^+$ происходит отщепление частицы в 142 а.е.м. Ее брутто-состав (табл.3) соответствует C₁₀H₉N₁. Этот фрагмент, судя по формуле, является арильным или гетарильным. Регистрация осколочного иона с m/z 143 состава [C₁₀H₉N₁]⁺ (табл.3) предполагает миграцию атома водорода при элиминировании частицы в 142 а.е.м. из $[M]^+$. Совокупность этих данных позволяет считать, что строение данного фрагмента может быть описано следующими арильными и гетерильными структурами (а-г):

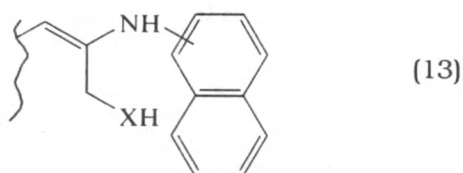


Возможность существования структурного фрагмента хинолинового (или изохинолинового)

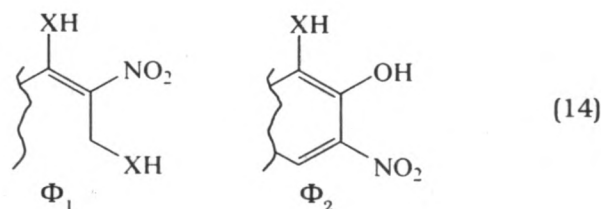
типа (форма-б,в) исключается (данные спектроскопии ЯМР). Вряд ли возможно ожидать и существование азепиновой структуры (г) - (данные ЯМР). Остается лишь один возможный вариант - это α - или β -аминонафталин. Выяснить характер замещения у вторичного иона в условиях миграции атома водорода вряд ли возможно, но сам вопрос возможной миграции водорода вызывает интерес. Можно предположить следующие системы, с учетом имеющихся данных литературы (д-з):



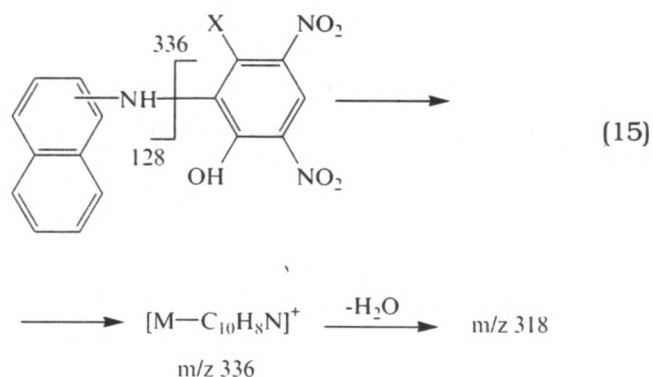
Анализ данных литературы показывает, что миграция атома водорода нереальна в системах дифениламина (структура д). Для структур типа (ж) и (з) такой процесс возможен [34], но атом водорода при кватернизованном углероде не виден в спектрах ЯМР. Миграция водорода через карбонильную группу никогда не происходит в масс-спектрометрии. Это означает, что структуры (д-з) не соответствуют реальному строению НС. Мы попытались провести химическую идентификацию и сделать отнесение к одному из данных типов соединений, а именно: мы провели пробу на присутствие системы дифениламина (НС+ капля конц. $H_2SO_4 \rightarrow$ раствор+ HNO_3) и наблюдали голубое окрашивание. Этот факт свидетельствовал в пользу структур (д) и (е). В таком случае миграция атома водорода может происходить лишь при "орто" расположении группы, содержащей подвижный водород (явление "ортоэффекта" [35]:



Затем, после образования иона $[M-C_{10}H_8N]^+$ с m/z 336, происходит последовательное элиминирование двух нитрогрупп - m/z 290 и 244 (Рис.4). Все характерные признаки, указывающие на присутствие двух нитрогрупп, есть (процессы элиминирования NO , NO_2). Удивителен процесс фрагментации, обусловленный потерей H_2O . Известны случаи отрыва частицы OH при орто-расположении нитрогруппы с какой-либо группировкой, содержащей атом водорода (OH , SH , NH_2 , $COOH$ и т.д.). Он может быть вызван двойной миграцией атомов водорода при возможной структуре Φ_1 или при наличии OH -группы, стоящей рядом с донором водорода (Φ_2):

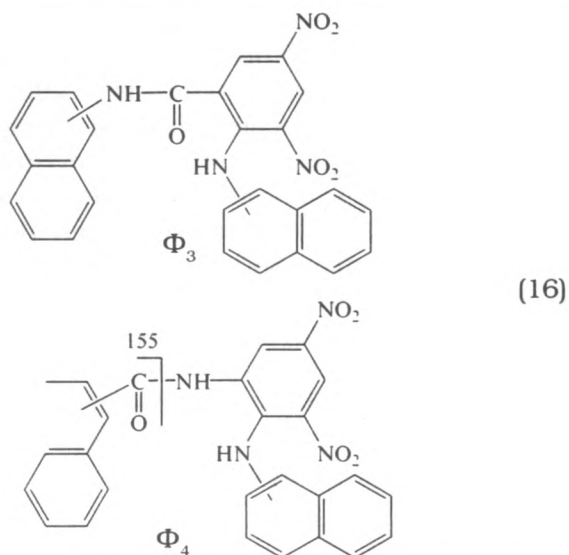


Таким образом, анализ масс-спектра (Рис.5) показывает, что оставшаяся часть молекулы структурно выглядит примерно следующим образом (X-ароматическая частица состава $C_{11}H_8N$):

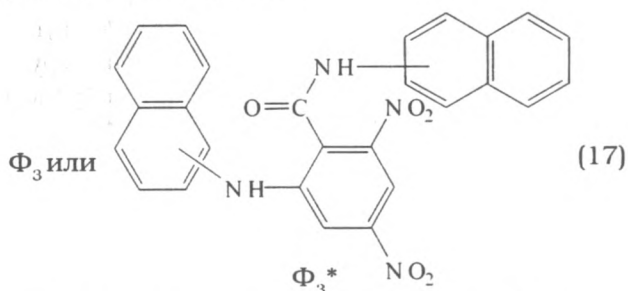


Частица "X" обладает высокой степенью ненасыщенности. Ароматической системы, включающей 11 атомов С, не существует. Атом азота не может находиться в цикле, т.к. в ГМР-спектре видны две NH -группы. Остается предполагать, что группа X представляет собой также α - или β -аминонафталин ($C_{10}H_8N$).

Недоказанной является функция одного атома С и атома О при дефиците атомов водорода (всего один). Тогда строение НС может иметь вид Φ_3 или Φ_4 :



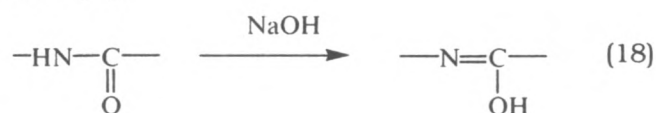
Как известно[32], амидная связь легко рвется под действием электронного удара. Поэтому при реализации структуры Φ_4 должен в масс-спектре регистрироваться ион с m/z 155, но его нет в масс-спектре (рис.5). Остается реальной структура Φ_3 . Сделать различия между двумя возможными изомерами по данным масс-спектрометрии невозможно:



При интерпретации масс-спектра НС сомне-

ния вызывает отщепление молекул H_2O от ионов с m/z 336 и от иона $[\Phi-NO_2]^+$ (табл.3), что косвенно предполагает наличие OH группы (смещение полосы поглощения в УФ-спектре при подщелачивании). Чтобы решить этот вопрос, мы провели реакцию ацетилирования по гидроксильной группе ($HC + (Ac)_2O + \text{пиридин}$). Однако в масс-спектре ацетилированного НС не наблюдалось увеличения мол. массы на 42 а.е.м., что исключало возможность ее существования.

Поэтому можно утверждать, что при подщелачивании раствора НС происходит таутомерный сдвиг в енольную форму (вероятно, при электронном ударе происходит аналогичное явление, т.к. только этим можно объяснить отрыв H_2O в масс-спектре):



Таким образом, анализ масс-спектрометрических данных с учетом результатов спектроскопических исследований показывает, что структура НС описывается формулой Φ_3 или Φ_3^* (характер замещения в ядре не установлен). Доказанное присутствие примесей существенно усложняет интерпретацию полученных данных.

Заключение

Предложенная методика подхода к установлению структуры НС, на наш взгляд, является оптимальной. Это положение вытекает из-за отсутствия ограничений по количеству анализируемой пробы (до уровня ррв.) и ее универсальности.

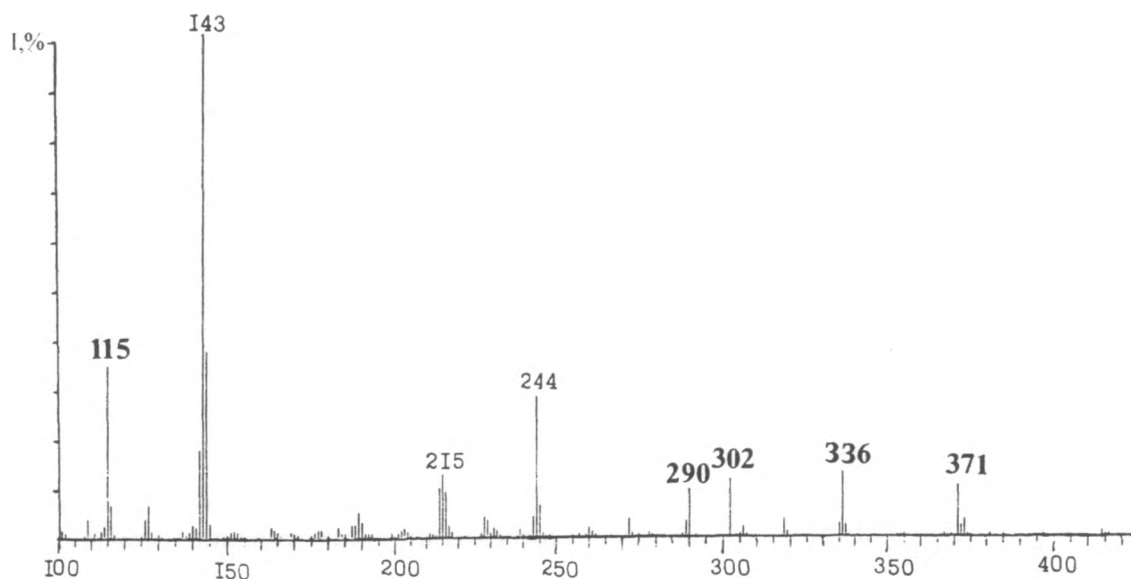


Рис.5. Масс-спектр неизвестного соединения

ЛИТЕРАТУРА

1. Идентификация органических соединений / Р. Шрайнер, Р. Фьюзон, Д. Кертин, Т. Моррил. М.: Мир, 1983. 704 с.
2. Мазор Л. Методы органического анализа. М.: Мир, 1986. 584 с.
3. Файгль Ф. Капельный анализ органических веществ. М. Л.: Госхимиздат, 1962. 537 с.
4. Kotianho T. // J. Mass Spectrometry. 1996. V.31. P.1-15.
5. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. М.: Мир, 1987. 429 с.
6. Korrick S.A., Altshul L. // Environment Health - perspectives. 1998. V.106, №8. P.513-518.
7. Karasek F.W., Onuska P.I. // Anal. Chem. 1982. V.54, №2. P.309A-324A.
8. Галль Л.Н., Туркина М.Я. // Успехи химии. 1985. Т.54, № 5. С.741-764.
9. Рафальсон А.Э., Смирнова Н.И. Современное состояние и тенденции развития масс-спектрометрии. Приборы, средства автоматизации и системы управления. М.: Информприбор, 1988. 45 с.
10. Баркер Ф. Компьютеры в аналитической химии. М.: Мир, 1987. 519 с.
11. Stenhagen E., Abrahamson S., McLafferty F.W. Atlas of mass spectral data. N-Y.: Interscience Publ., 1969. V.1-3. 1863 p.
12. Новые физические и химические методы исследования органических соединений / Б.В. Иоффе, И.Г. Зенкевич, М.А. Кузнецов, Н.Я. Бернштейн. Л.: ЛГУ, 1984. 240 с.
13. Заикин В.Г., Микая А.И. Химические методы в масс-спектрометрии органических соединений. М.: Наука, 1987. 197 с.
14. Лабораторное руководство по хроматографии и смежным методам / Под. ред. О. Микеш. М.: Мир, 1982. Т.1. 400 с.
15. Хроматография. Практическое приложение метода / Под. ред. Э. Хефтман. М.: Мир, 1986. Т.1. 336 с. Т.2. 422 с.
16. Levsen K., Schwarz H. // Mass Spectrom. Rev. 1983. V.2. P.77-148.
17. Архипов Д.Б., Галль Л.Н. / ЖАХ, 1999. Т. 54, № 6. С.585-512.
18. Клюев Н.А., Истратов Э.И., Хмельницкий Р.А., Сущов В.П., Русинов В.Л., Зырянов В.А. // ЖОрХ. 1977. Т.13, № 7. С.1501-1507.
19. Клюев Н.А. // Аналитика и контроль. 1998. № 2(4). С.4-14.
20. Сильверстейн Р., Басслер Г., Меррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений. // М.: Мир, 1977. 422 с.
21. Полякова А.А., Хмельницкий Р.А. Масс-спектрометрия в органической химии // Л.: Химия, 1972. 367 с.
22. Клюев Н.А., Абраменко П.И., Шпилева И.С., Пинкин Л.Д. // ХГС. 1982. № 6. С.758-761.
23. Соловьев А.А., Каденцев В.И., Чижов О.С. Масс-спектрометрия... // Успехи химии, 1979. Т.48. С.1130-1231.
24. Иоффе Б.В., Зенкевич И.Г. Интерпретация масс-спектров органических соединений. Л.: Химия, 1986. 176 с.
25. Зенкевич И.Г. // ЖАХ, 1998. Т.53, № 1. С.43-49.
26. Математические методы в химии / 5-я Всесоюзная конференция: Тез. докл. Грозный, 1985. 312 с.
27. VII Всесоюзная конференция по использованию вычислительных машин в химических исследованиях и спектроскопии молекул: Тез. докл. Рига, 1986. 296 с.
28. Джурс И., Айзенауэр Т. Распознавание образов в химии. М.: Мир, 1977. 230 с.
29. Дерендяев Б.Г., Нехорошев С.А., Лебедев К.С., Киржанский С.Н. // ЖАХ, 1994. Т.46. С.1870-1878.
30. Дерендяев Б.Г., Лебедев К.С. Новое поколение ИПС по масс-спектрометрии: Тез. докл. Сумы: Электрон, 1986. Секция 3. С.52-53.
31. Эляшберг М.Е., Грибов Л.А., Серов В.В. Молекулярный спектральный анализ и ЭВМ. М.: Наука, 1980. 308 с.
32. Хмельницкий Р.А., Бродский Е.С. Хромато-масс-спектрометрия. М.: Химия, 1984. 211 с.
33. Есипов С.Е., Клюев Н.А., Мир-Кадырова Е.Я. // Успехи в области изучения и производства антибиотиков. 1985. №14. С. 316-322.
34. Клюев Н.А., Мальцева Г.А., Хмельницкий Р.А., Шейнкман А.К., Дейкало А.А., Ступникова Т.В. Известия ТСХА 1974. №3. С.200-208.
35. Schwarz H. // Top.Curr. Chem. 1975. V.73. P.231-268.

* * * * *